

# 出土木材 PEG 処理液の腐敗原因と防除対策

木川 りか

## 1. はじめに

静岡県埋蔵文化財調査研究所は、出土した木材のポリエチレングリコール (PEG) 含浸処理装置を設置し、清水市で出土した丸木舟の PEG 含浸処理を 1993 年 6 月 1 日から開始した。東京国立文化財研究所は、同所から 1993 年 6 月 15 日にその丸木舟を 5%PEG 400 溶液に浸漬して 1 週間後に強い腐敗臭が発生したという連絡を受けたので調査を行った。浸漬後 2 週間目の試料を詳細に観察すると、PEG 溶液中には細菌や藻類等が、溶液界面の被膜には細菌やカビが認められた。筆者は、60℃に加温して 1 時間保つ低温殺菌を繰り返す方法を提案した。しかし、低温殺菌処理後間もなく、再び腐敗臭が発生した。腐敗の原因を根本的に究明するために、腐敗微生物を分離、同定して、その対策を検討したので報告する。

## 2. 試料の採集

丸木舟は、清水市巴川で 1990 年 6 月に出土したもので、全長約 5 m、重量約 1.4 t、クスの巨木による一木づくりである (写真-1)。出土丸木舟は、丸木舟本体部含浸槽 (E 槽) と、左船尾の崩壊部含浸槽 (B 槽) に分けて PEG 処理が行われていた。採集した試料は、次のとおりである。すなわち、

- ①丸木舟本体含浸槽 (E 槽) 5% (PEG 重量/PEG を加える前の水の重量) PEG 400 溶液界面に形成された乳白色被膜。採取日：1993 年 6 月 29 日
- ②E 槽の 5%PEG 400 溶液。採取日：1993 年 8 月 4 日
- ③丸木舟本体を覆っていた不織布の一部。採取日：1993 年 8 月 4 日
- ④丸木舟本体から採取した木片。採取日：1993 年 8 月 4 日

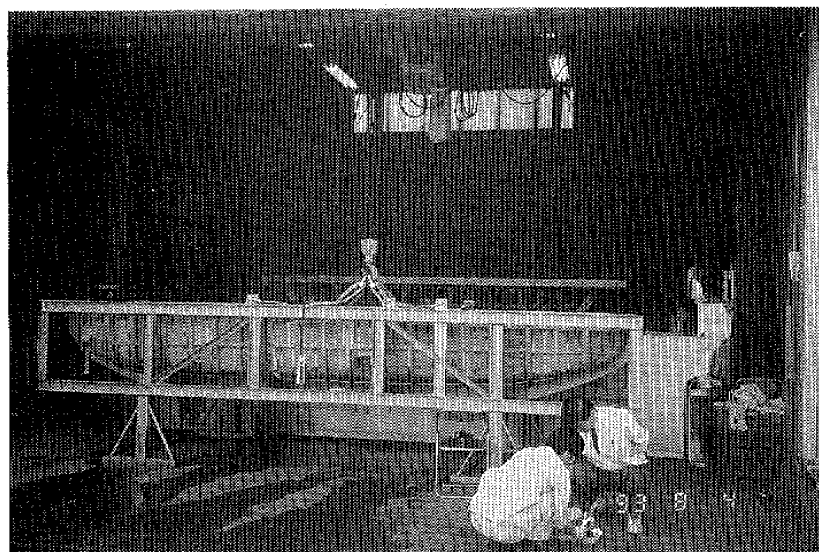


写真-1 静岡県清水市巴川出土丸木舟と PEG 溶液含浸槽  
(1993 年 8 月 4 日)

⑤丸木舟崩壊部含浸槽 (B 槽) 5%PEG 400 溶液。採取日：1993 年 8 月 2 日

⑥B 槽、液交換後 2 日目の水。採取日：1993 年 8 月 4 日

ただし、①は 60℃加熱前の試料であり、発生した乳白色被膜は加熱処理の前に除去された。5% PEG 400 含浸処理は、1993 年 6 月 1 日から室温で開始された。

### 3. 腐敗原因微生物の分離・同定

腐敗臭のする PEG 含浸槽から採取した試料から、細菌とカビの分離、計測を行った。

#### 3-1. 細菌について

細菌培養用の TY 寒天培地 (1% ポリペプトン、0.5% 乾燥酵母エキス、0.5% NaCl、1.5% 寒天、pH 7.0) を用いて希釈平板法で 25℃、48 時間培養後の細菌コロニー数を計測し、PEG 試料等 1 ml 中の細菌数を求めて表-1 に示した。採取した PEG 水溶液中には  $1.5 \sim 8.5 \times 10^6$  個/ml の細菌が生息しており、試料①の乳白色被膜溶液には  $1.7 \times 10^7$  個/ml の細菌が計測された。一般に、①の乳白色被膜のように溶液界面に被膜を形成する微生物は、好気性の微生物である。一方、丸木舟崩壊部含浸槽 (B 槽) で、PEG 溶液を廃棄交換して 2 日後の水試料からは、ほとんど細菌が検出されなかった。分離された細菌の主たるものは、グラム陰性の擬球あるいは短桿菌であった。

#### 3-2. カビについて

試料①、③、④は、素寒天培地および PDA 培地 (バレイショ・ブドウ糖培地)<sup>1)</sup> に各 4 検体を接種して、27℃で 7 日間培養した。その結果、試料①の乳白色被膜では、クラドスポリウム菌

表-1 腐敗 PEG 溶液等の細菌数\*

試料名	細菌数 (個/ml)
①. E 槽乳白色被膜溶液 (6/29)	$1.7 \times 10^7$
②. E 槽溶液 (8/4)	$1.5 \times 10^6$
⑤. B 槽溶液、廃棄前 (8/2)	$8.5 \times 10^6$
⑥. B 槽溶液、廃棄交換後 (8/4)	~ 3

\* 各々の試料溶液を滅菌水で  $10^2$  倍、 $10^3$  倍、 $10^4$  倍に希釈し、0.2 ml を TY 寒天培地 (1% ポリペプトン、0.5% 乾燥酵母エキス、0.5% NaCl、1.5% 寒天、pH 7.0) に拡げて 25℃で 48 時間培養し、出現したコロニー数より生菌数を計算した。

表-2 被膜および固形試料からのカビの分離

試料名	菌分離*
①. 乳白色被膜 (6/29)	4/4**
③. 不織布 (8/4)	0/4
④. 木片 (8/4)	0/4

\* 分子：真菌分離数 分母：試験数

\*\* *Cladosporium* sp.

(*Cladosporium* sp.)が、接種した4検体すべてから分離された。しかし、試料③の不織布及び試料④の木片からは、カビが検出されなかった。

#### 4. PEG 溶液腐敗原因の検討

低濃度のPEG溶液では、微生物が遊離したグリコールを炭素源として利用し、腐敗することがある。さらに、PEG溶液中に木材の浸出液等が含まれる場合には、窒素源など他の栄養素が加わって細菌の増殖が促進され、腐敗の程度は一段と顕著になると考えられる。本実験結果から、今回のPEG溶液の腐敗は、主としてグラム陰性の擬球あるいは短桿菌によることが明らかとなった。以下、細菌による腐敗要因について考察を行った。

##### 4-1. 栄養源

出土丸木舟の含浸に用いたPEG 400 およびその含有不純物などが腐敗微生物の栄養源となった可能性もある。そこで、今回使用したPEG 400 (三洋化成工業製)の5%溶液に少量の腐敗溶液試料を接種し、28℃で培養するとわずかな増殖はおこるものの、7日培養後にも顕著な細菌の増殖はみられなかった(表-3)。これに対して、5%PEG 400 溶液に炭素源、窒素源を加え、同様に少量の腐敗溶液を接種して培養すると、1昼夜で顕著な細菌の増殖が観察された(写真-2、B、C、左から2番目)。これより、今回の処理で使用したPEG 400のみでは腐敗原因菌がさほど顕著には増殖せず、著しい腐敗は、処理溶液に新たに栄養分が加わった結果と推測された。出土丸木舟は、平均含水率200%のかなり硬い状態をとどめたクス材で、保存状態は良好であったということである。このような場合、残存する木材成分が浸出して栄養源となり、細菌の増殖を促進したと推測される。木材成分の浸出程度は、処理する木材によって異なる。

##### 4-2. 腐敗原因微生物

PEG 400 溶液試料から分離した主な細菌は、グラム陰性の擬球あるいは短桿菌であった。これまでに、分子量1000以下のPEGを分解するグラム陰性の短桿菌分離の報告があるが<sup>2,3,4)</sup>、今回の分離菌株は、対照として供試した*Bacillus subtilis* (枯草菌)と、5%PEG溶液中での増殖速度がほとんど変わらなかった(表-3および表-4)。

##### 4-3. PEGの濃度および分子量が細菌の増殖に与える影響

一般にPEG溶液含浸開始時には、20%PEG 4000溶液が用いられるが、今回の5%PEG 400溶液は、濃度、平均分子量が異なっていた。そこで、PEG濃度およびPEG分子量が分離細菌の増

表-3 5%PEG 400 溶液中の細菌の増殖 (個/ml)

培養日数	3日		7日	
	<i>B. subtilis</i>	分離菌	<i>B. subtilis</i>	分離菌
供試菌株				
防菌剤濃度 (%)				
対照 0	$3.3 \times 10^3$	$7.1 \times 10^3$	$4.6 \times 10^4$	$4.5 \times 10^4$
ホクサイド R-150				
0.05	0	0	0	0
0.1	0	0	0	0
0.5	0	0	0	0
ホクサイド LX-2				
0.05	0	0	0	0
0.1	0	0	0	0
0.5	0	0	0	0

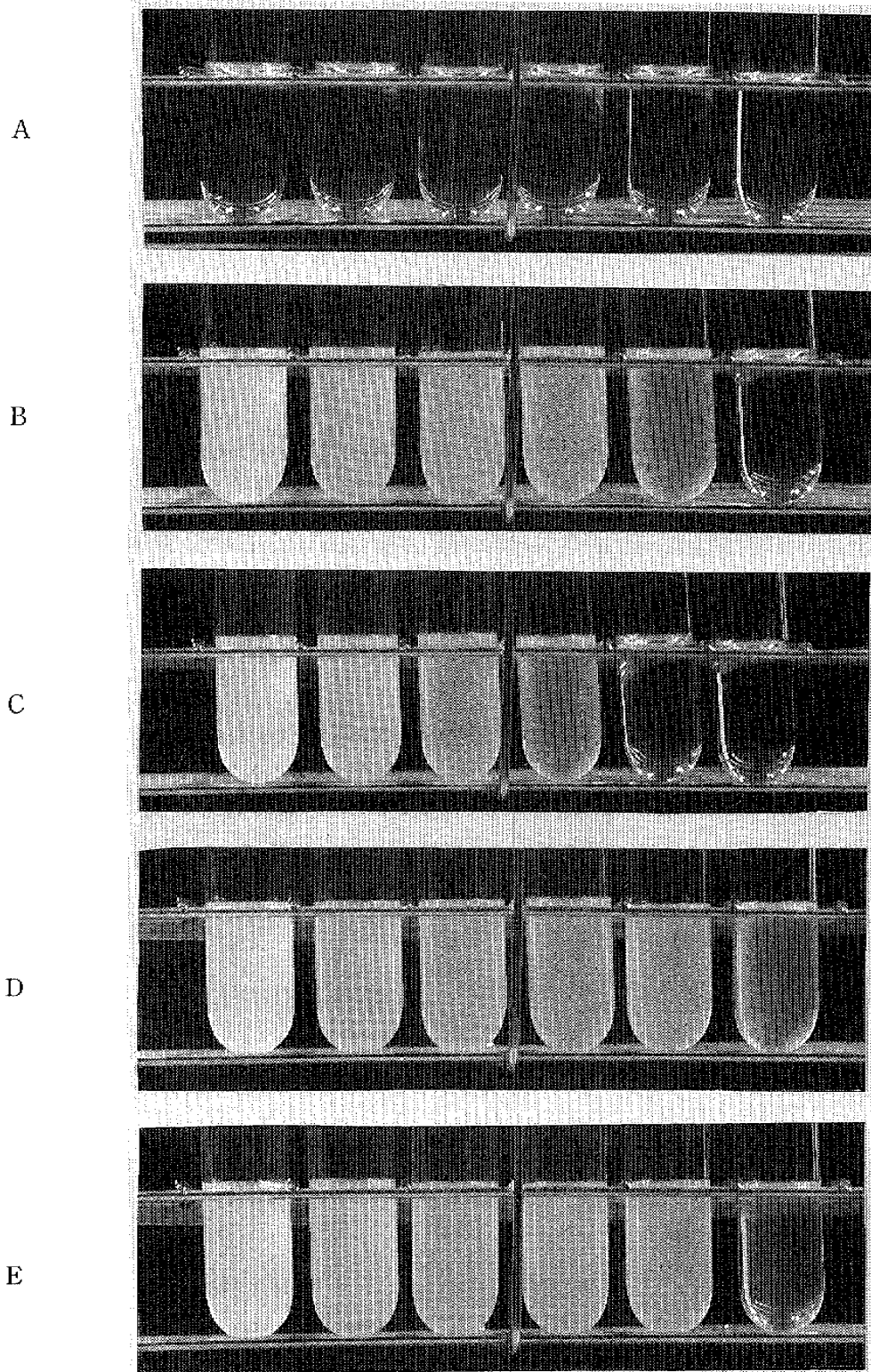


写真-2 PEG 溶液濃度と腐敗原因細菌の増殖度

<A、BおよびC> 左より順に0、5、10、15、20、40% (PEG重量/PEG添加前の水重量)のPEG 400溶液に0.1%乾燥酵母エキス、0.2%ポリペプトン、0.2%グルコースを加え、静岡県埋蔵文化財調査研究所の水道水50 $\mu$ l (A)、試料①を滅菌水で25倍希釈したもの50 $\mu$ l (B)、試料⑤50 $\mu$ l (C)を各々植えた後、28 $^{\circ}$ Cで24時間培養した。<DおよびE> 上と同様にPEG 4000の0、5、10、15、20、40%溶液に0.1%乾燥酵母エキス、0.2%ポリペプトン、0.2%グルコースを加えたものに、試料①を滅菌水で25倍希釈したもの50 $\mu$ l (D)、試料⑤50 $\mu$ l (E)を植えた後、28 $^{\circ}$ Cで24時間培養した。

表-4 Davis 改変\* 5%PEG 400 溶液中の細菌の増殖 (個/ml)

培養日数	3 日	
供試菌株 防菌剤濃度 (%)	<i>B. subtilis</i>	分離菌
対照 0	$5.8 \times 10^4$	$5.4 \times 10^4$
ホクサイド R-150		
0.05	$5.5 \times 10^4$	$2.1 \times 10^2$
0.1	$4.6 \times 10^4$	$1.8 \times 10^2$
0.5	0	0
ホクサイド LX-2		
0.05	$4.3 \times 10^4$	$4.1 \times 10^2$
0.1	$2.5 \times 10^4$	0
0.5	0	0

\*Davis 改変培地組成：  
 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.1%  
 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.7%  
 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2%  
 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.01%  
 $\text{Na citrate}$  0.05%  
 5%PEG 400 水溶液

殖に及ぼす影響を検討した。

PEG 400 および PEG 4000 (いずれも三洋化成工業製) の 0、5、10、15、20、40% (PEG 重量/PEG を加える前の水重量) 溶液に YPD 培地 (1% 乾燥酵母エキス、2% ポリペプトン、2% グルコース) を 1/10 容量添加したものに、試料①、試料⑤を一定量ずつ加え、28℃で 24 時間培養した。その結果、PEG 400、PEG 4000 とともに濃度が高くなるほど供試菌が増殖しにくくなった (写真-2)。したがって、PEG 濃度の 5% は、細菌の増殖しやすい条件である。また、外部から栄養源を添加した場合、PEG 平均分子量の差と細菌の増殖との間に有意の差が認められなかった。

#### 4-4. 温度条件

PEG 溶液含浸処理は、1993 年 6 月 1 日から開始され、梅雨期にあたっていたこと、また、処理温度が 20℃ 前後 (外気温) であったことも微生物の繁殖に好都合であったといえよう。さらに、丸木舟の樹種が保存処理の難しいクス材であるために、60℃ 以上の恒常的な加温ができないことも微生物の繁殖に有利であったと考えられる。

## 5. 腐敗防止対策の検討

一般的な微生物の簡便な殺菌処理法としては、加温処理がある。しかし、さきに PEG 溶液の 60℃ 加温殺菌を 3 回繰り返す処置を試みた結果、腐敗臭を完全に防止できなかった。材質への影響を考慮して、60℃ 以上での恒常的な処理が不可能である場合には、その他の対策を講ずる必要がある。

### 5-1. 好気性微生物に対する酸素遮断法

PEG 溶液腐敗の主因となった微生物は、今回は好気性のカビや細菌であった。これは、PEG 含浸槽の溶液界面に微生物による被膜が形成されていたことから示唆される。よって、PEG 含浸槽の溶液界面に接触する空気を遮断すれば、これらの微生物の増殖は抑制される。溶液界面をビニルシートで覆う処置がとられ、良好な結果が得られた。

## 5-2. 防菌防黴剤の利用

### 5-2-1. 防腐効力の実験方法

低毒性で材質への影響の少ない防菌防黴剤2種類について、分離菌株および標準菌株を供試して最小発育阻止濃度 (MIC) を検討した。すなわち、

- 防菌防黴剤： (1) イソチアゾロン (ホクサイド R-150)  
(2) ベンズイソチアゾロン (ホクサイド LX-2)
- 供試菌株： 標準菌株 *Bacillus subtilis*  
分離菌 試料①、②、⑤、⑥を混合して供試

実験は、5%PEG 溶液単独と、5%PEG 溶液に硫酸アンモニウム、リン酸カリウム等を溶解した Davis 改変培地 (表-4) に2種の防黴剤をそれぞれ0 (対照)、0.05、0.1、0.5%に溶解した後、供試菌株を接種して27°Cで3日および7日後の細菌数を計測し、表-3、4に示した。

### 5-2-2. 結果

i) 5%PEG溶液単独の場合、供試した標準菌株 *Bacillus subtilis* および分離菌株は、5%PEG 溶液中で緩慢に増殖していた (表-3)。すなわち、PEG 溶液単独でも28°C、7日間の培養で  $5 \times 10^4$ /ml 程度までは細菌が増殖し得る。5%PEG 溶液の腐敗は供試した防菌防黴剤を0.05%以上で加えたとき完全に阻止された。

ii) 5%PEG 溶液中に、出土木材を浸漬したとき、出土木材の劣化生成物が溶液中に溶出することが考えられる。そこで、Davis の培地を改変した5%PEG 溶液に供試菌株を接種したときの増殖と薬剤の防腐効果を検討した。その結果、防菌防黴剤0.1%では腐敗原因細菌の生育を阻止できず、0.5%で阻止し得た (表-4)。

## 6. まとめ

腐敗臭の発生した PEG 含浸液について微生物学的調査研究を実施した。その結果、5%PEG 溶液からは、主としてグラム陰性の擬球あるいは短桿菌が分離され、カビは試料①から *Cladosporium* sp. が分離された。そして、腐敗は、主に細菌に起因することが判明した。顕著な細菌の増殖の原因として、PEG 濃度が低かったこと、処理温度が室温程度であったこと、そして出土木材から溶液中に浸出した栄養分が考えられる。木材成分の浸出程度は、出土木材によって異なるが、今回の保存状態の良いクス材が特に腐敗しやすいものであったかどうかの因果関係は不明である。

今回 PEG 含浸槽の腐敗の主因となった細菌は、好気性細菌に属するので、PEG 含浸槽の溶液表面の通気をビニルシートで遮断し、良好な結果が得られた。

低毒性で材質への影響の少ない防菌防黴剤を取捨選択して、イソチアゾロン (ホクサイド R-150) とベンズイソチアゾロン (ホクサイド LX-2) の5%PEG 溶液に対する防腐効果を検討した。その結果、これらの防菌防黴剤は5%PEG 溶液に供試した防菌防黴剤を0.5%の濃度で用いれば、Davis 改変培地の養分が与えられている条件下でも分離菌の生育を阻止し、PEG 溶液の腐敗防止に有効であった。

文化財の水漬け処理は常に微生物の繁殖の危険性にさらされているといっても過言ではない。時として、文化財の材質がむしばまれたり、その危険性は無い場合にも、変色や完成品に腐敗臭が残るといった事態にもなり得る。今後、ここで用いた加温処理、防菌防黴剤などの方法の他にも、処理溶液のみを物理的に殺菌するなど、個々の文化財の性質に合った方法を開発し、幅広い対策

を講じていく必要があると考える。

## 謝 辞

本調査研究を遂行するにあたり、細菌の同定に関しては東京大学分子細胞生物学研究所の川崎浩子氏、カビの同定および防菌防黴剤の効力試験にあたっては北興産業㈱の松岡正幸氏、荒川正澄氏に多大な御協力をいただきましたことに深甚の謝意を表します。また、調査にあたってご援助下さいました静岡県埋蔵文化財調査研究所の西尾太加二氏に感謝いたします。東京国立文化財研究所保存科学部生物室長の門倉武夫氏、同所名誉研究員の新井英夫氏には終始有益なご助言とご指導をいただきました。記して感謝の意を表します。

## 参 考 文 献

- 1) 東京大学農学部農芸化学教室編, 「実験農芸化学 下」 第3版, 朝倉書店, 1978
- 2) Ogata, K., Kawai, F., Fukaya, M., Tani, Y.: Isolation of Polyethylene glycol-assimilable bacteria., *J. Ferment. Technol.*, 53, 757-761 (1975)
- 3) Kawai, F., Kimura, T., Tani, Y., Yamada, H., Involvement of polyethylene glycol (PEG) oxidating enzyme in the bacterial metabolism of PEG, *Agric. Biol. Chem.* 48, 1349-1351 (1984)
- 4) 鈴木智雄、土井明夫: “有害物質を分解・除去する微生物 1. 合成ポリマー” 「微生物の分離法」, pp. 557-663, *R&D プランニング*, 1986

## Investigation of Bacterial and Fungal Attack in the PEG Treatment of Excavated Wood

Rika KIGAWA

PEG (polyethyleneglycol) treatment is a popular method for the conservation of excavated wood. However, growth of microorganisms in the PEG solution is sometimes experienced during treatment. The author investigated a case of PEG 400 treatment of a dugout canoe.

The dugout canoe made of camphor wood is 515cm by length, 127cm by central width, 64cm by height, 1.4ton by weight. It was excavated in June 1990 at Tomoe-river, Shizuoka, Japan. The age of the canoe was estimated at 700~800 years (Kamakura period) by radiocarbon dating. The PEG treatment of the canoe was started in June 1993 in a 5% PEG 400 (Sanyo-kasei) solution at Shizuoka Research Institute of Buried Cultural Properties. One week after soaking the canoe in this solution, putrid smell occurred in the treatment tank. The author investigated the cause of the putrefaction of the PEG solution. Major microorganisms that caused the putrefaction of the PEG solution turned out to be gram-negative short rod bacteria. The authors also isolated fungi (*Cladosporium* sp.) from the white layer on the surface of the solution. Active growth of microorganisms are considered to be induced by:

- (1) extracts from the excavated camphor wood,
- (2) low concentration of PEG 400 (5%),
- (3) moderate temperature (around 20°C) suitable for treatment for camphor wood.

In this case, the microorganisms that contributed to the putrefaction are supposed to be aerobic microorganisms. Thus, the surface of the PEG solution was covered with vinyl sheets to shut out aeration. It was effective in preventing further putrefaction. The authors also tested two kinds of biocides (Isothiazolone, Benzisothiazolone), both of which were effective to the isolated bacteria and fungi.